植物病理學會刊　12:215-224, 2003

影響莧菜葉枯病菌 *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB 形成有性世代的因子

林信甫[1]　黃振文[1,3]　謝廷芳[2]

1 台中市 國立中興大學植物病理學系
2 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植物病理組
3 聯絡作者：電子郵件 jwhuang@dragon.nchu.edu.tw ，傳眞：+886-4-22851676
接受日期：中華民國92 年8 月30 日

摘　要

林信甫、黃振文、謝廷芳. 2003. 影響莧菜葉枯病菌形成有性世代的因子. 植病會刊12:215-224.

測試七種土壤覆蓋資材對莧菜葉枯病原菌 *Thanatephorus cucumeris* (teleomorph of *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB) RSA-03 和RSA-09 兩菌株形成有性世代的影響，結果發現BVB No. 4 栽培介質可穩定地誘使莧菜葉枯病菌大量形成子實層。進一步，修正Naito 氏等之土壤覆蓋法 (soil-cover-culture method) 生產擔孢子的流程如下：將 *R. solani* 接種於含1% (w/v) 酵母抽取物之 Potato-yeast extract-dextrose agar (PYDA) 培養基平板(內徑9 公分)，在28℃ 下培養四天，隨後覆蓋90 ml 土壤[含有 40% (v/v) BVB No.4 栽培介質及 40-50% (v/v) 水分]，移置於濕室中四天後，在覆蓋的土壤表面可穩定產生大量絨毛狀灰白色的子實層。本研究修正過的栽培介質土壤覆蓋法(peat moss- soil-cover-culture method) 所產生的子實層表面積約爲 Naito 氏土壤覆蓋法所生產者的三至四倍。莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09 兩菌株形成有性世代的最適溫度與酸鹼値分別爲 24-28℃ 及 pH 5-7。在土壤中加入有機、無機添加物及農藥等均會干擾本菌子實層的形成，其中土壤中添加1% (v/v) 魚粉、苦茶粕及苦楝可顯著抑制本菌產生子實層與擔孢子。此外，土壤注入鋅錳乃浦、免賴得、貝芬替、福多寧、五氯硝苯、依普同及賓克隆等化學農藥，亦皆會抑制本菌子實層的形成。

關鍵詞：*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB、*Thanatephorus cucumeris* 、有性世代、子實層

緒　言

Rhizoctonia solani Kühn 爲世界性分布的重要土壤傳播性病原菌 (5,19)，普遍存在於耕作土壤之中，引起各種植物的不同型態病害，如種子腐敗、幼苗倒伏、根腐、莖腐、基腐及農產品之腐爛等 (1)。一般而言，*R. solani* 常引起作物根部與地基部的病害，惟有些植物亦可受 *R. solani* 的有性世代 *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk 擔孢子感染地上部的莖與葉。這些寄主植物包括柑橘、甜菜、大豆、菜豆、黃麻、地栗黃蒿、橡膠樹、棉花、煙草、芝麻、水稻、蕃茄、甘蔗、甘藍、莧菜、龍葵和金午時花等 (2,6,10,18,24,26,28)。目前誘使 *R. solani* 形成有性世代的方法有很多，如土壤覆蓋法 (soil-cover-culture method) (15,16,22,23)、分隔培養皿法 (two compartment petri plate method) (3)、處理眞菌劑 (13) 和植物殘體 (26) 等。然而 *R. solani* 有性世代的形成會受到溫度、相對濕度、通氣性、光照及培養基營養源等因子的影響。一般而言，溫度高於 20℃ 且相對濕度大於 90% 才會使其形成子實層 (18)。此外，光線亦會影響有性世代的形成，Flentje (9) 指出在光強度 200~2000 燭光 (lux) 的範圍，始可促進 *R. solani* 形成子實層; 然而 Uchida 等氏 (25) 卻報導光線會抑制擔孢子的成熟，因此產孢通常均在晚上發生 (7)。另外，提供氧氣及移除二氧化碳，也是本菌產孢的必需條件 (4)。本文主要目的在於探討影響莧菜葉枯病菌影響有性世代的因子，祈有助於找出防治本病的有效方法。

材料與方法

供試菌株

西元 1999-2000 年夏季與秋季分別赴西螺、苗栗、台中和埔里的莧菜栽培區採集莧菜葉枯病罹病株，經 1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液消毒30 秒後，移置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基(Water agar, WA) 進行組織分離，待菌絲長出

後，切取菌絲尖端移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato dextrose agar, PDA, Difco) 斜面上培養，共得RSA-01 ~ RSA-10 等8個*R. solani* AG2-2IIIB 菌株。利用土壤覆蓋法 [17] 獲取它們的擔孢子後，按照柯霍氏法則進行測試，確定各菌株之病原性後，除比較各菌株的產孢能力外，其餘各試驗主要以RSA-03 和RSA-09 兩菌株作爲本研究的供試菌種。

土壤覆蓋法誘導莧菜葉枯病菌產生有性世代

將培養於PDA 培養基上三天之RSA-03 和RSA-09 菌株，以口徑6 mm 的打孔器，於菌落邊緣切取菌絲塊，移置於馬鈴薯酵母抽出物葡萄糖瓊脂培養基 (potato-yeast extract-dextrose-agar, PYDA) [17] 平板，在28℃ 培養約3-4 天，待菌絲長滿培養皿 (內徑9 cm) 時，覆以90 ml 的土壤 (Sandy loam, pH 5.4, organic matter 1.82%，由台中縣大里農田取得)，厚度約1 cm [17,23]，土壤水份含量保持在40-50% (v/v) 左右。將覆土後之培養皿置於塑膠籃 (45×35×10 cm^3) 中，每籃放置12 個培養皿，然後將籃子移入濕室 (90×90×90 cm^3) 中保濕，在室溫下靜置四天後，觀察RSA-03 和RSA-09 產生子實層的情形。子實層產量的計算方法如下: 將產生子實層的培養皿以數位相機拍照存檔後，利用影像處理軟體(Photoshop 5.0, Adobe, American) 將培養皿劃分爲75 個等面積方格，然後估算子實層出現面積佔整個培養皿表面積的百分比。

不同覆蓋資材對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

選用岩棉 (oasis)、蛭石 (vermiculite)、珍珠石 (perlite)、水草 (sea weed)、椰子纖維 (coconut fiber)、香菇太空包堆肥 (spent forest mushroom compost, SFMC)、荷蘭泥炭苔培養土 (Bas Van Burren，BVB No. 4) 等七種不同資材，各 10 ml 分別覆蓋於長滿RSA-03 與RSA-09 菌株的PYDA 平板上的土壤表面上，並保持水份含量在40-50% (v/v) 左右，隨後將培養皿置於籃子中，並將籃子置於濕室中保濕，在24℃，四天後，觀察紀錄不同覆蓋資材表面形成子實層的情形。其中以不另外覆蓋任何資材之處理作爲對照組，每處理四重複。

不同比例 BVB No. 4 栽培介質添加於土壤中對子實層形成的影響

將0、1、5、10、20、40、60、80 及100% (v/v) BVB No. 4 栽培介質與土壤充分混合後，取90 ml 混合土壤，依前述土壤覆蓋法進行覆蓋處理，在28℃ 濕室中保濕，四天後，記錄莧菜葉枯病菌產生子實層的面積百分率，每一處理有四重複。

莧菜葉枯病菌不同菌株產生子實層的比較

將莧菜葉枯病菌RSA-01、RSA-03、RSA-04、RSA-06、RSA-07、RSA-08、RSA-09 及RSA-10 等菌株 [2]，在28℃，培養於PYDA 培養基上，待菌落長滿培養基平板後，以90 ml 含有 40% BVB No. 4 栽培介質的土壤覆蓋之，於28℃ 濕室內靜置四天，記錄各菌株產生子實層的面積百分率，每處理菌株有四重複。

不同培養基及酵母抽出物對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

配製CMA (Corn Meal Agar)、CA (Czapek-Dox Agar)、GPA (Glucose Peptone Agar)、GYA (Glucose Yeast Agar)、MSA (Malt Salt Agar)、PDA (Potato Dextrose Agar)、PYDA (Potato Yeast extract Dextrose Agar)、SMA (Soybean Meal Agar)、V8 (V8 Juice Agar)、YA (Yeast extract Agar) 等10 種不同培養基 [8]。以口徑6 mm 滅菌過的打孔器切取培養於PDA 平板上一天之RSA-03 和RSA-09 菌株之菌絲塊，再移植於各種培養基平板中央，在28℃ 下，待菌落長滿培養基平板，隨即覆蓋含有40% BVB No. 4 栽培介質土壤，每處理四重複。於28℃ 下，保濕四天後，觀察不同培養基對子實層形成的影響。此外，在各培養基配方中，分別再添加0.5% (w/v) 的酵母抽出物，接種RSA-03 與RSA-09 後，亦按上述栽培介質土壤覆蓋法探討培養基添加酵母抽出物與否，對於兩菌株產生子實層的影響，每一處理均有四重複。

不同土壤來源對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

選取大里 (Tali, sandy loam, pH 5.4, organic matter 1.82%)、中興 (Chung-Hsing, sand, pH 7.8, organic matter 0.15%)、溪湖 (Hsihu, silt loam, pH 7.1, organic matter 4.8%)、霧峰 (Wufeng, loam, pH 6.9, organic matter 1.05%)、西螺 (Hsilo, fine sandy loam, pH 8.2, organic matter 0.63%) 和后里 (Houli, sandy loam, pH 7.2, organic matter 0.94%) 等不同來源的土壤，分別覆蓋於長滿*R. solani* RSA-03 與RSA-09 兩菌株之PYDA 平板上，在28℃ 濕室中保濕，四天後，觀察不同來源的土壤對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響。另外各土壤中分別加入40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質後，進行土壤覆蓋法處理，四天後，觀察記錄不同來源的土壤加入BVB No. 4 栽培介質後，莧菜葉枯病菌形成子實層的影響。此外，也在第四天將培養皿移出濕室外，持續再觀察三天，每一處理有三重複。

溫度對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

在28℃ 下以PYDA 培養RSA-03 和RSA-09 兩菌株，待菌落長滿9 cm 培養皿，以含有40% BVB No. 4 栽培介質的大里土壤，進行土壤覆蓋處理，保持土壤水份40-

50%，隨後將各覆土培養基分置於紙箱子(30×20×13 cm^3)中保濕，並逢機將各箱子分別置於 8、12、16、 20、24、28、32 及36℃ 等不照光的定溫箱中，四天後，估算RSA-03 與RSA-09 菌株在不同溫度下形成子實層的表面積百分率。每一溫度處理有四重複。

不同土壤 pH 値對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

利用 1N KOH 及 HCl 調整含有 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質土壤的酸鹼值爲 pH 3、4、5、6、7、8、9、10、11 及 12，隨後依前述方法利用土壤覆蓋法誘導RSA-03 與RSA-09 兩菌株形成子實層，在室溫下(24-28℃)，於濕室中保濕，四天後，觀察記錄覆蓋不同 pH 值土壤，對子實層形成的影響。每一處理有四重複。含 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質土壤的原始pH 值爲6.25。

有機添加物對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

將含有 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質土壤，分別加入 1% (v/v) 之苦楝粉 (chinaberry meal)、黃豆粉 (soybean meal)、煙渣粉 (tobacco debris)、蝦蟹殼粉 (crab and shrimp shell powder)、苦茶粕 (tea seed pomace)、炭化稻殼 (carbonized rice hull)、魚粉 (fish meal)、肉骨粉 (bone-meat meal) 及牛血粉 (blood meal) 等有機添加物，分別進行覆蓋處理，保持土壤水份 40-50%，於室溫下，濕室中靜置四天後，觀察記錄有機添加物對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響。其中並以不添加有機添物處理作爲對照，每一處理各有四重複。

農藥對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

將 1 g 或 1 ml 之鋅錳乃浦 (mancozeb)、免賴得 (benomyl)、貝芬替 (carbendazim)、福多寧 (flutolanil)、五氯硝苯 (PCNB)、依普同 (iprodione) 和賓克隆 (pencycuron) 等七種不同的化學農藥 (表一) 加水至 1000 ml，配製濃度爲 1000 ppm 之水溶液。將長滿 PYDA 培養基的莧菜葉枯病菌 RSA-03 和RSA-09，以含 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質土壤進行覆蓋處理後，分別加入 1000 ppm 農藥水溶液 30 ml，保持水份含量在 40-50% (v/v)，於室溫下，濕室中靜置四天，觀察記錄農藥對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響。其中並以不加農藥處理作爲對照，每一處理各有四重複。

結　果

土壤覆蓋法誘導莧菜葉枯病菌產生有性世代

將莧菜葉枯病菌培養於 PYDA 培養基上，待菌落長滿培養皿，以土壤覆蓋法進行處理，在室溫下，培養基平板覆蓋土壤後的第二天，即可見到莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 的菌絲由培養皿邊緣往土表生長，當土壤適合子實層形成時，覆蓋後第三天即會出現子實層，到第四天時子實層的產生趨於穩定。土表的子實層呈緻密絨毛白色粉狀覆蓋物 (圖一、A)。白色粉狀物移至顯微鏡下觀察時，證實均是本菌的擔孢子 (圖一、B)。

不同覆蓋資材對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

利用七種資材進行覆蓋處理，發現只有BVB No. 4 栽培介質覆蓋於土表，可顯著促進子實層的產生，而其餘之資材均無法促進子實層形成。顯示BVB No. 4 栽培介質確實可以誘使菌株RSA-03 和RSA-09 大量形成子實層，且約爲土壤覆蓋對照組產量的四至五倍(圖二)。

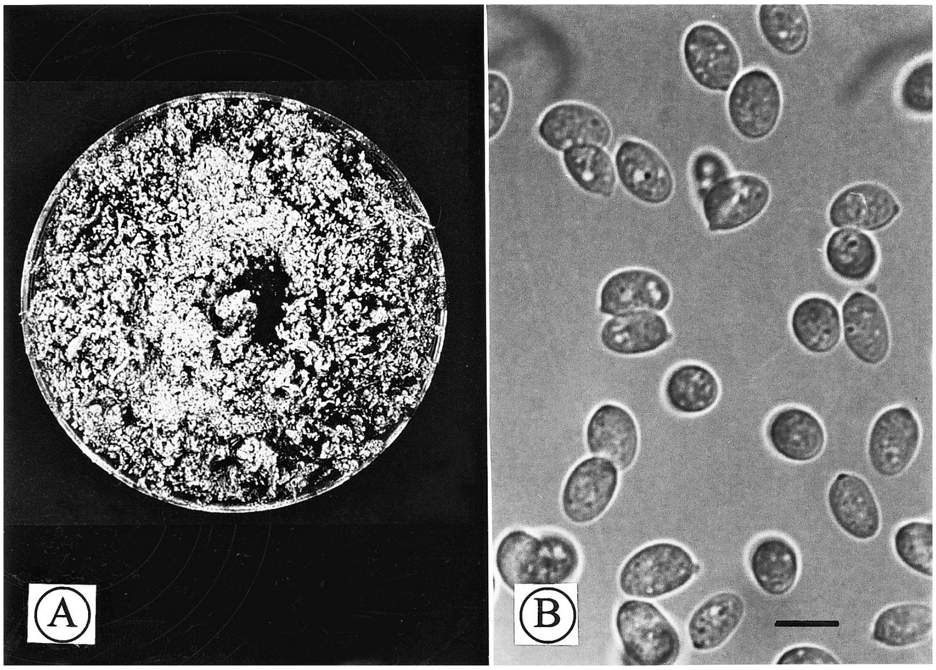
不同比例 BVB No. 4 栽培介質添加於土壤中對子實層形成的影響

經由覆蓋資材篩選後，證明BVB No. 4 栽培介質可穩定地誘導本菌產生子實層。當土壤中添加 1-40% (v/v)

表一、本研究所使用的農業藥劑普通名、中文名、化學名及製造廠商

Table1. List of common names, Chinese name, chemical names and manufacturers of fungicides tested in this study

Common name	Chinese name	Chemical name	Manufacturer
Mancozeb	鋅錳乃浦	80% WP Contains 16% manganese^{++}, 2% zinc^{++} and 62% ethylenebisdithiocarbamate ion	Du pont
Benomyl	免賴得	50.0% WP Methyl-1-1-(butylcarbamo-yl)-2-benzimidazole carbamate	Du pont
Carbendazim	貝芬替	50% WP 2-(methoxycarbonylamino)-benzimidazole	BASF
Flutolanil	福多寧	50% WP N-[3-(1-methylethoxy)phenyl]-2-(trifluoromethyl) benzamide	Chia-Nung
PCNB	五氯硝苯	75.0% WP Pentachloronitrobenzene	Tocelo
Iprodione	依普同	50% WP 3-(3,5-Dichlorophenyl)-1-isopropyl carbamoylhydantoin	Phone-Poulenc
Pencycuron	賓克隆	25% WP N-[(4-chlorophenyl)methyl]-N-cyclopentyl-N'-phenylurea	Bayer



圖一、利用土壤覆蓋法誘生*Thanatephorus cucumeris* 子實層。(A)子實層於土表形成的情形, (B)顯微鏡下觀察子實層產生的擔孢子 (Bar = 10 μm)。

Fig. 1. Induction of the hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* with soil-cover-agar method. (A) Formation of a hymenium of *Thanatephorus cucumeris* on the soil surface. (B) Basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* were observed under light microscope (Bar = 10 μm).

BVB No. 4 栽培介質時，子實層形成的表面積隨添加BVB No. 4 栽培介質量的增加而增加(圖三)，當BVB No. 4 添加比例達 40% (v/v) 時，子實層的形成量最多。其中RSA-03 形成的子實層比率可達覆蓋土壤表面積的 60%，而RSA-09 形成子實層的量更可達土表面積的80% (圖三)。

莧菜葉枯病菌不同菌株產生子實層的比較

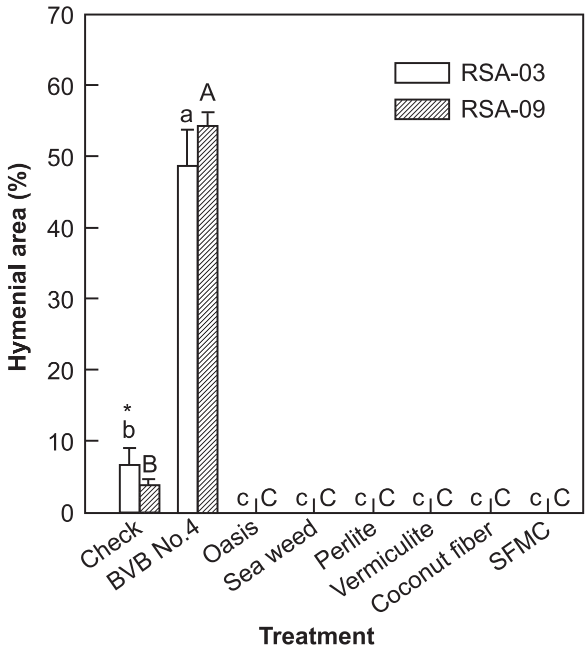
本菌不同菌株間形成子實層的能力有顯著差異，在供試的八個菌株中，RSA-03、RSA-06、RSA-07 和RSA-09 菌株可形成較大量的子實層，而 RSA-01、RSA-04 及 RSA-10 產生較少量的子實層，至於RSA-08 卻不形成子實層 (圖四)。

不同培養基及酵母抽出物對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

十種培養基中，大部份的培養基皆可誘使莧菜葉枯病菌產生子實層，惟不同成分的培養基對於子實層形成的影響效果差異頗大。RSA-03 菌株在GPA、PYDA 及SMA 培養基上可形成大量的子實層；而RSA-09 菌株則在PYDA 和 YA 培養基上可形成大量的子實層。另外，在十種培養基中，分別再添加 0.5% 的酵母抽出物，發現大部份的培養基添加酵母抽出物後，皆可顯著促進子實層的產生；惟若原始的培養基可促進本菌大量形成子實層時，若再添加0.5% 酵母抽出物，對本菌子實層的形成則隨菌株的不同，而有不一致的促進效果，例如RSA-03 菌株在 PYDA 及 SMA 培養基上即可形成大量子實層，雖再添加酵母抽出物，對其子實層的形成並無顯著的影響 (表二)；然而針對RSA-09 菌株，在此兩種培養基添加酵母抽出物卻會增進子實層的形成。

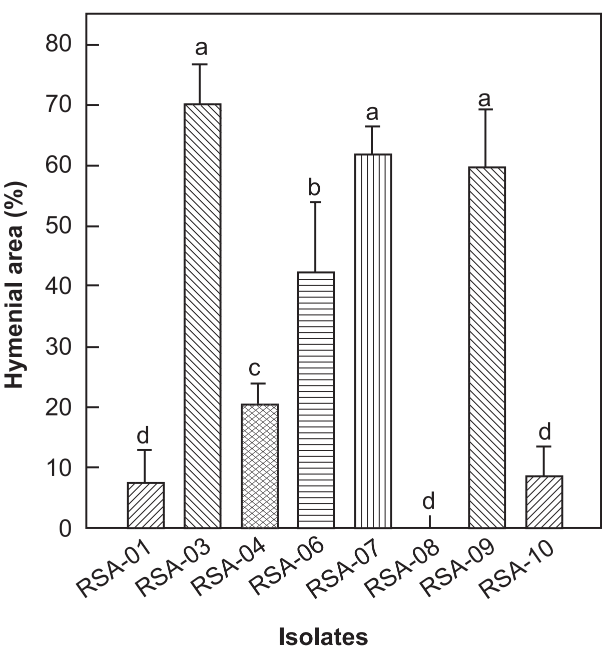
不同土壤來源對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

在六種土樣中，發現不同來源的土壤，對於莧菜葉枯病菌 RSA-03 和RSA-09 子實層的形成有不同的影響。其中溪湖土和霧峰土對於莧菜葉枯病菌子實層的形成有正面的效果。RSA-03 與RSA-09 菌株分別以溪湖土及霧峰土覆蓋，子實層形成可達覆蓋土壤表面積 30%；其次爲大里土和中興土可達 20% 左右；RSA-03 被西螺土和后里土覆蓋則幾乎不形成子實層 (表三)；若將培養皿移至濕室外，觀察時間延長至第七天，發現除西螺土外，其它處理之子實層的形成皆有增加的趨勢。此外將不同地區的土壤分別加入 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質後再進行覆蓋處理，發現不同地區的土壤，不論原來土壤對於莧菜葉枯病菌形成子實層的影響如何，在分別添加入 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質後，皆可大量誘使子實層的產生，甚至原來不能促進本菌產生子實層的土壤，亦可誘使子實層大量形成 (表三)。



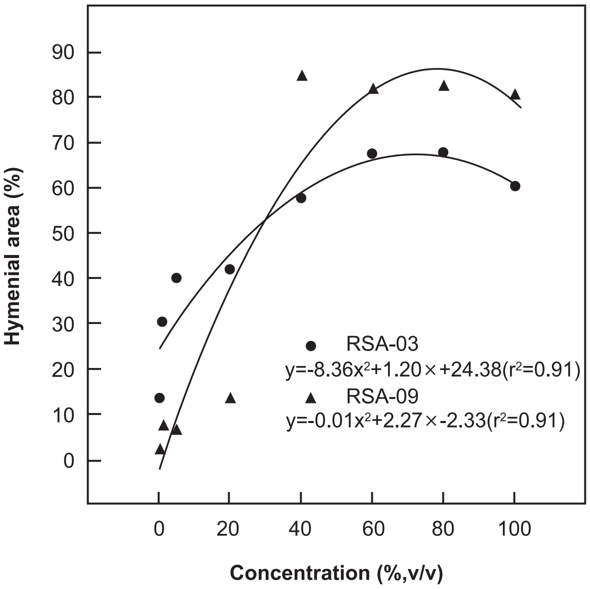
圖二、不同覆蓋資材對莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 菌株形成子實層的影響 (第四天的結果) 。

Fig. 2. Effect of soil surface covered with various materials on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09) for 4 days. (SFMC: Spent forest mushroom compost; Check: Tali soil). *Columns (n=4) in eight treatments for hymenial area followed by the same letter do not differ significantly (*P*=0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖四、不同莧菜葉枯病菌菌株產生子實層的比較 (第四天的結果)。

Fig. 4. Comparison of hymenial formation of different isolates of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB) on soil surface. The covered soil was amended with 40% BVB No.4 peat moss. Data were recorded 4 days after soil covering. *Columns (n=4) in eight isolates for hymenial area followed by the same letter do not differ significantly (*P*=0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖三、土壤添加不同濃度的 BVB No.4 (v/v) 對莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 兩菌株產生子實層的影響 (第四天的結果) 。

Fig. 3. Effect of soil amended with various concentrations of BVB No.4 peat moss on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09). Data were recorded 4 days after soil covering.

溫度對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

將覆蓋40% (v/v) BVB No.4 栽培介質土壤的培養皿，置於濕室中，然後再將濕室移置於8-36℃ 不同溫度之定溫箱內四天，結果發現在 20-28℃ 間，莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 皆可形成子實層；惟溫度在 16℃ 以下或32℃ 以上時，即不形成子實層。最適RSA-03 菌株形成子實層的溫度爲 20℃，超過20℃ 時，子實層的形成隨溫度的升高而遞減 (圖五)。RSA-09 菌株形成子實層的最適溫度爲 28℃；由16 至28℃ 間，子實層的形成隨溫度的升高而增加，當溫度超過 28℃，子實層的形成隨溫度的升高而明顯下降 (圖五) 。

不同土壤 pH 值對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

RSA-03 和RSA-09 菌株以製備好的不同 pH 值BVB No. 4 栽培介質土壤進行覆蓋，四天後，發現土壤pH 範圍在5-7 時最適合本菌子實層的形成，惟從 pH 8 至 pH 12，子實層的形成量逐漸遞減 (圖六) 。

有機添加物對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

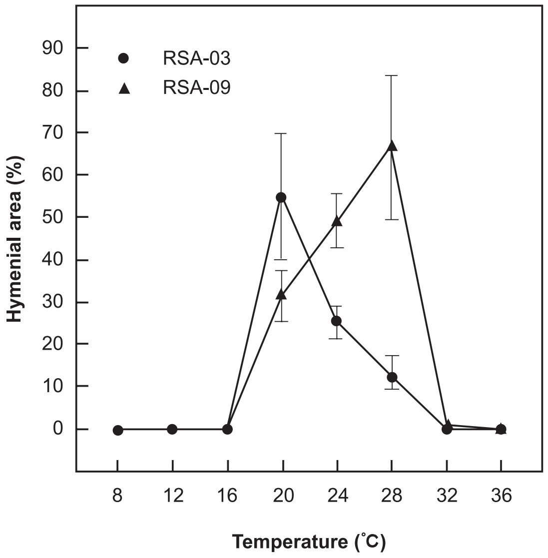
將含 40% (v/v) BVB No. 4 栽培介質土壤，分別加入

表二、不同培養基對莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09兩菌株形成子實層的影響(第四天的結果)

Table 2. Effect of various culture media amended with and without yeast extract on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09) for 4 days at 28℃

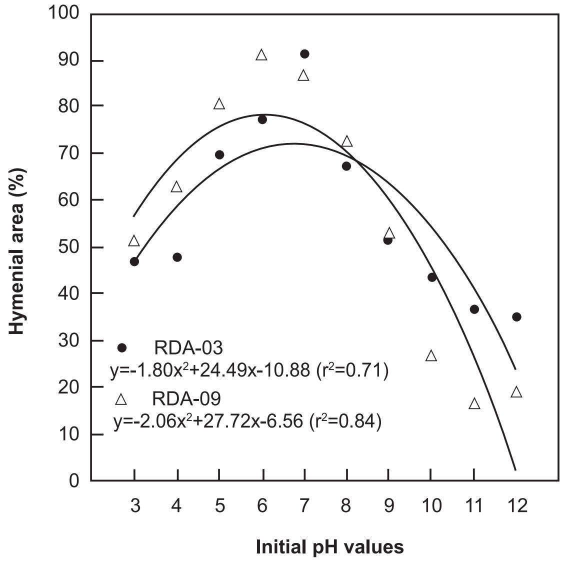
Culture medium [1]	Hymenial area(%) [2]			
	RSA-03		RSA-09	
	Without YE	With YE [3]	Without YE	With YE
CMA	4.63 a [4]	2.31 a	0.00 b	78.50 a
CA	3.24 b	69.91 a	1.02 b	65.50 a
GPA	73.15 b	91.67 a	44.90 b	89.00 a
GYA	19.91 b	72.69 a	47.96 b	92.00 a
MSA	0.00 b	40.28 a	0.00 b	35.50 a
PDA	45.00 b	77.36 a	22.34 b	67.13 a
PYDA	80.00 a	88.21 a	79.79 b	96.76 a
SMA	75.91 a	78.77 a	41.49 b	92.59 a
V8	47.73 b	82.55 a	28.72 a	39.81 a
YA	37.73 b	86.32 a	64.89 b	92.59 a
LSD [5]	9.79	13.94	10.47	9.08

1. CMA: Corn meal agar, CA: Czapek solution agar, GPA: Glucose peptone agar, GYA: Glucose yeast agar, MSA: Malt salt agar, PDA: Potato dextrose agar, PYDA: Potato yeast dextrose agar, SMA: Soybean meal agar, V8: V8 juice agar, YA: Yeast extract agar.
2. Percentage of hymenia covered on the soil surface.
3. Each culture medium contained 0.5% (w/v) yeast extract (YE).
4. Data between amendment and non-amendment for each isolate followed by the same letters are not significantly different according to Student's t-test (P=0.05).
5. Least significant difference (P=0.05).



圖五、溫度對莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09兩菌株形成子實層的影響(第四天的結果)。

Fig. 5. Effect of temperatures on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* on the soil surface. Soil contained 40% (v/v) BVB No. 4 peat moss (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09). Data were recorded 4 days after soil covering.



圖六、不同土壤pH值對莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09菌株形成子實層的影響(第四天的結果)。

Fig. 6. Effect of different pH values on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09) on soil surface. Data were recorded 4 days after soil covering.

1% (v/v) 有機添加物後，覆蓋於RSA-03與RSA-09的PYDA培養基平板，發現牛血粉可促進子實層的形成，至於添加肉骨粉和蝦蟹殼粉對兩菌株形成子實層無明顯影響。添加炭化稻殼、煙渣粉及黃豆粉會些微抑制子實層的形成；但添加魚粉、苦茶粕及苦楝渣則幾乎完全抑制子實層的形成(圖七)。

農藥對莧菜葉枯病菌形成子實層的影響

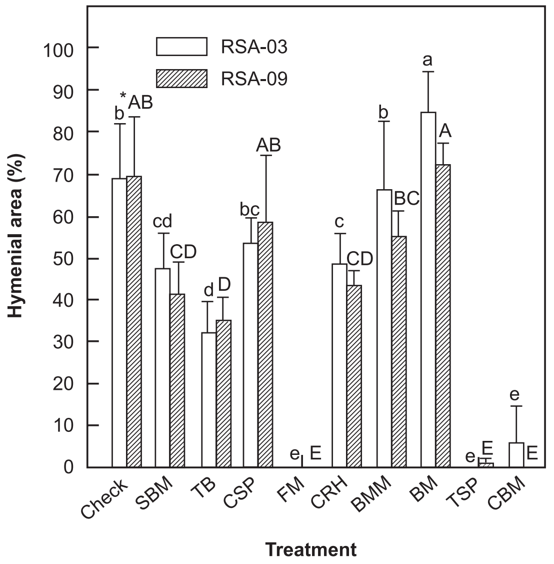
以40% (v/v) BVB No. 4栽培介質土壤進行土壤覆蓋後，分別加入1000 ppm的鋅錳乃浦、免賴得、貝芬替、福多寧、五氯硝苯、 依普同或賓克隆等七種農藥，皆會顯著抑制子實層的產生，甚至鋅錳乃浦及福多寧可完全抑制RSA-09形成子實層(圖八)。

表三、不同來源土壤對莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 兩菌株形成子實層的影響(第四天及第七天的結果)

Table 3. Effect of various soils amended with and without 40% (v/v) BVB No.4 peat moss on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG-2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09) for 4 and 7 days

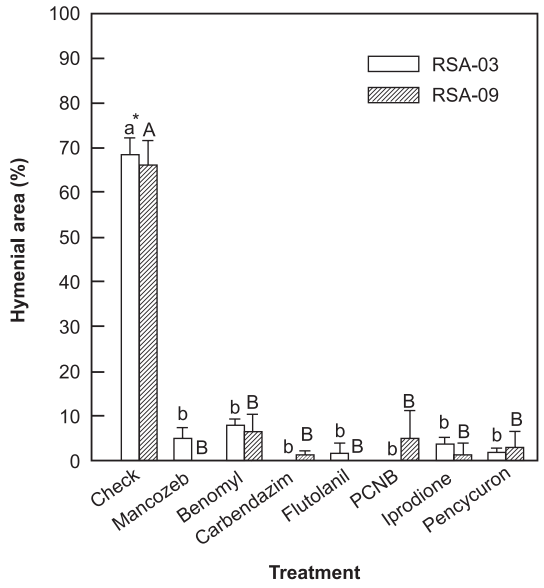
Soil sources	Hymenial area (%)[1]							
	RSA-03				RSA-09			
	4days[2]		7days[3]		4days		7days	
	Non-amended	Amended[4]	Non-amended	Amended	Non-amended	Amended	Non-amended	Amended
Tali	28.3 b[5]	55.3 a	58.4 b	80.0 a	10.6 b	49.8 a	70.5 a	69.2 a
Chung-Hsing	25.7 b	70.5 a	64.8 b	76.6 a	28.6 b	64.3 a	52.9 b	76.2 a
Hsihu	37.8 b	86.9 a	42.9 b	89.7 a	64.0 b	94.8 a	77.8 b	95.0 a
Wufeng	32.2 b	60.5 a	39.0 b	72.0 a	32.2 b	68.2 a	33.7 b	74.0 a
Hsilo	0.0 b	63.9 a	0.0 b	59.1 a	0.0 b	48.4 a	0.0 b	66.3 a
Houli	2.0 b	78.6 a	14.0 b	75.0 a	13.9 b	77.6 a	34.8 b	68.9 a
LSD[6]	11.2	15.8	10.8	11.1	11.0	16.6	8.8	11.1

1. Percentage of hymenia covered on the soil surface.
2. Experiments were kept in moist chamber for 4 days.
3. Experiments were kept in moist chamber for 4 days then removed to outside for further 3 days under the shade condition.
4. Each soil sample was amended with 40% (v/v) BVB No.4 peat moss.
5. Data between amendment and non-amendment for each isolate at 4th or 7th day after treatment followed by the same letters are not significantly different according to Student's t-test (P=0.05).
6. Least significant difference (P=0.05).



圖七、有機添加物對莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09兩菌株形成子實層的影響 (第四天的結果)。

Fig. 7. Effect of covered soil contained 1% (v/v) organic amendments on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09). Data were recorded 4 days after soil covering. (CBM : Chinaberry meal, SBM : Soybean meal, TB : Tobacco debris, CSP : Crab and shrimp shell powder, TSP : Tea seed pomace, CRH : Carbonized rice hull, FM : Fish meal, BMM : Bone-meat meal, BM : Blood meal , Check : None). *Columns (n=4) in ten treatments for hymenial area followed by the same letter do not differ significantly (P=0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖八、農業化學藥劑對莧菜葉枯病菌RSA-03 和 RSA-09 菌株形成子實層的影響(第四天的結果)。

Fig. 8. Effect of covered soil added 1000 ppm of various kinds of fungicides on hymenial formation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB isolates RSA-03 and RSA-09). Data were recorded 4 days after treatment. *Columns (n=4) in eight treatments for hymenial area followed by the same letter do not differ significantly (P=0.05) according to Duncan's multiple range test.

討 論

許多報告指出*R. solani*可於自然界形成有性世代*T. cucumeris*的子實層，且產生的擔孢子可以引起許多植物葉部病害[2,11,14,18,20,21,25,29]。近年來台灣的莧菜栽培田，經常發現莧菜罹患葉枯病的情形，罹病葉的病斑經分離鑑定其病原菌爲*R. solani* AG 2-2 IIIB[2,10]。經由田間觀察病害分布及病徵表現，以及人工誘生擔孢子接種結果，確定本病是由*R. solani*的有性世代*T. cucumeris*所造成[11]。爲了進一步研究莧菜葉枯病的生態，必須以人工的方法誘導有性世代的產生，但是要穩定取得*R. solani*的有性世代子實層極爲不易。據報導誘導*R. solani*產生有性世代形成的方法包括添加植物殘體法[26]、處理殺眞菌劑法[13]、分隔培養皿法[3]及土壤覆蓋法[9]等，其中土壤覆蓋法廣泛的被使用，且經多次修正[12,15,17,22,23]。早期的土壤覆蓋法，是以玉米砂培養病原菌後製成混菌土，再將混菌土以不同比率混入土壤中，保持高濕度，即可使*R. solani*形成子實層[9]。經過許多學者的修正後，演變成以土壤來覆蓋培養基，使*R. solani*形成子實層。本研究曾經依Naito氏等[17]的土壤覆蓋法來誘導莧菜葉枯病菌產生子實層，但結果並不穩定，有時子實層產生的量差異極大，甚至偶有完全不產生。本試驗經篩選不同覆蓋資材，得知BVB No. 4栽培介質可使莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09穩定的形成子實層，且由試驗中得知當土壤中加入BVB NO. 4栽培介質後子實層產生的量，隨著添加BVB NO.4栽培介質量的增加，子實層產生的表面積隨之增加，而添加40% BVB No.4 (v/v)栽培介質時，則可穩定的使子實層形成。本研究亦發現不同來源土壤對於莧菜葉枯病菌形成子實層各有不同影響，子實層形成的表面積由0-60%不等，差異頗大; 但是若將土壤再個別添加40% BVB No. 4 (v/v)栽培介質後，則皆可大量促進子實層的形成，由此可知BVB No. 4栽培介質確實是適合莧菜葉枯病菌形成子實層的覆蓋資材。

適合*R. solani*形成子實層的溫度範圍爲20-30℃[9,18,26]，本試驗得知莧菜葉枯病菌子實層形成的適合溫度爲20-28℃，與文獻所報告的溫度範圍相仿。培養基成分亦會影響*R. solani*形成子實層，Adams和Butler兩氏[3]利用分隔培養皿誘導*R. solani*產生有性世代的試驗中，發現生長培養基中$NaNO_3$的濃度和產孢培養基使用的水瓊脂培養基廠牌都會影響*R. solani*有性世代的形成，由此可知，培養基的成分確實會影響子實層的形成。本試驗中嘗試選取10種不同的培養基，觀察不同培養基對於莧菜葉枯病菌子實層形成的影響，結果發現SMA、GPA和PYDA對於子實層的形成皆有不錯的效果，若是將各培養基分別加入0.5% (v/v)酵母抽出物後，發現可以大量刺激子實層的形成，可見酵母抽出物有利於莧菜葉枯病菌形成子實層。其它影響子實層形成的因子中，光照會抑制*R. solani*形成子實層[7,27]，而光強度在200～2000燭光範圍內皆適合*R. solani*形成子實層[9]。相對濕度越高越有利於*R. solani*形成子實層，尤其在接近100%的相對濕度尤佳[16]。另外，通氣性對於*R. solani*形成子實層也有影響，若二氧化碳濃度大於0.03%時，會抑制*R. solani* AG-4形成子實層[4]。本試驗並未對光照、相對溼度和通氣性作進一步詳細試驗，但是在試驗過程中，確實發現莧菜葉枯病菌只有在高濕度的濕室中，才會形成子實層，且若濕室完全密封不透氣，則子實層形成亦會減少；若土壤表面已有*R. solani*菌絲的培養皿，惟不產生子實層時，將它由濕室移至室外，則可見子實層的產生。由此可知通氣性亦是子實層形成的重要因子之一。

雖然誘導*R. solani*產生有性世代的方法有很多，但是由文獻中發現誘使不同菌絲融合群的*R. solani*產生有性世代的方法皆有所不同，例如以殺眞菌劑誘導，只會使AG 1和AG 2-2菌絲融合群菌株產生有性世代[13]；另外，以分隔培養皿法誘導時，僅會使AG 1、AG 4和AG 5菌絲融合群菌株產生有性世代[3]；此外，Murray[15]修正後的土壤覆蓋法只適合AG 1菌絲融合群菌株產生有性世代。綜合上述可知，即使同一菌絲融合群的不同*R. solani*分離株，產生有性世代的能力也有所不同，因此沒有任何一個方法可適合所有的*R. solani*產生有性世代。

在土壤中加入有機添加物對本菌子實層的形成亦有影響，例如添加魚粉、苦茶粕和苦楝等可顯著抑制子實層的形成，因此有機栽培田可在有機肥或土壤表面拌入適量的魚粉、苦茶粕，藉以減少本菌的發生。本研究所採集的莧菜葉枯病菌株，大部分是由不噴農藥的有機莧菜栽培田及農民自己留種的採種田採集獲得；此外本研究發現農民常用的農藥皆具有抑制子實層形成的效果，顯示一般農田經常噴灑農藥，可以有效控制本病的發生。

引用文獻

1. 吳文希. 1988. 植物土媒病原學. 國立編譯館. 台北. 259頁。
2. 林信甫、謝廷芳、黃振文. 2002. 莧菜葉枯病菌之鑑定與侵染過程. 植病會刊11:33-44。
3. Adams, G. C., Jr., and Butler, E. E. 1983a. Influence of nutrition on the formation of basidia and basidiospores in *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 73: 147-151.
4. Adams, G. C., Jr., and Butler, E. E. 1983b. Environmental factors influencing the formation of basidia and basidiospores in *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 73: 152-155.
5. Anderson, N. A., Stretton, H. M., Groth, J. V., and Flentje, N. T. 1972. Genetics of heterokaryosis in *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 62: 1057-1065.

6. Atkins, J. G. Jr., and Lewis, W. D. 1954. *Rhizoctonia* aerial blight of soybeans in Louisiana. Phytopathology 44: 215-218.
7. Carpenter, J. B. 1949. Production and discharge of basidiospores of *Pellicularia filamentosa* (Pat.) Rogers on *Hevea rubber*. Phytopathology 39: 980-985.
8. Dhingra, C. D., and Sinclair, J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, INC, New York. 355pp.
9. Flentje, N. T. 1956. Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat.) Roger. I. Formation of the perfect state. Trans. Br. Mycol. Soc. 39:343-356.
10. Hsieh, T. F., Chang, C. C., and Chang, Y. C. 1996. *Rhizoctonia* leaf spot of Chinese spinach in Taiwan. Plant Prot. Bull. 38:375-376 (Abstr).
11. Hsieh, T. F. and Lin, H. F. 1997. Distribution pattern of Chinese spinach leaf spots associated with basidiospore infection of *Thanatephorus cucumeris*. Plant Prot. Bull. 39:400 (Abstr).
12. Hyakumachi, M., and Ui, T. 1988. Development of teleomorph of non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* by a buried-slide method. Plant Pathol. 37:438-440.
13. Kangatharalingam, N., and Carson, M. L. 1988. Technique to induce sporulation in *Thanatephorus cucumeris*. Plant Dis. 72: 146-148.
14. Luke W. J., Pinckard J. A., and Wang S. C. 1974. Basidiospore infection of cotton bolls by *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 64: 107-111.
15. Murray, D. I. L. 1982. A modified procedure for fruiting *Rhizoctonia solani* on agar. Trans. Br. Mycol. Soc. 79: 129-135.
16. Naito, S. 1984. Studies on foliage blight of sugar beets. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. 139: 145-188.
17. Naito, S., Mochida, H., Nakajima, T., and Ohto, Y. 1995. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG 2-3 of *Rhizoctonia solani*) and develpoment of soybean foliar blight lesions. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 362-368.
18. Naito, S. 1996. Basidiospore dispersal and survival. Pages 197-205 *in: Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular, Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Sneh, B. *et al.* eds. Kluwer Academic Publishers, London.
19. Parmeter, J. R. Jr., Whitney, H. S., and Platt, W. D. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 57: 218-223.
20. Shew H. D., and Main C. E. 1985. Rhizoctonia leaf spot of flue-cured tobacco in North Carolina. Plant Dis. 69: 901-903.
21. Shew, H. D., and Main, C. E. 1990. Infection and development of target spot of flue-cured tobacco caused by *Thanatephorus cucumeris*. Plant Dis. 74 :1009-1013.
22. Stretton, H. M., McKenzie, A. R., Baker, K. F., and Flentje, N. T. 1964. Formation of the basidial stage of some isolates of *Rhizoctonia*. Phytopathology 54:1093-1095.
23. Tu, C. C., and Kimbrough, J. W. 1975. A modified soil-cover-culture method for inducing basidia in *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 65: 730-731.
24. Tu, C. C., Cheng, Y. H., and Kimbrough, J. W. 1977. A new species of *Thanatephorus* from jute in Taiwan. Mycologia 69: 409-413.
25. Uchida, J. Y., Aragaki, M., and Yahata, P. S. 1986. Basidiospore formation by *Ceratobasidium* sp. on agar. Mycologia 78:587-592.
26. Ullstrup, A. J. 1939. The occurrence of the perfect stage of *Rhizoctonia solani* in plantings of diseased cotton seedlings. Phytopathology 29:373-374.
27. Whitney, H. S. 1964. Sporulation of Thanatephorus cucumeris (*Rhizoctonia solani*) in the light and in the dark. Phytopathology 54: 874-875.
28. Windels, C. E., Kuznia, R. A., and Call, J. 1997. Characterization and pathogenicity of *Thanatephorus cucumeris* from sugar beet in Minnesota. Plant Dis. 81: 245-249.
29. Yik, C. P., and Wong, J. L. 1992. Characterisation of *Rhizctonia solani* causing leaf rots of vegetables in Singapore. Singapore J. Pri. Ind. 20: 97-110.

ABSTRACT

Lin, H. F.,[1] Huang, J. W.[1, 3] and Hsieh, T. F.[2] 2003. Factors affecting formation of hymenia of *Thanatephorus cucumeris* (teleomorph of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB), the causal agent of Chinese amaranth foliage blight. Plant Pathol. Bull. 12:215-224. ([1.] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan; [2.] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA, Wufeng 413, Taiwan.; [3.] Corresponding author, E-mail: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw; Fax: +886-4-22851676.)

In the study, Naito's soil-cover culture method was modified for production of hymenia of *Thanatephorus cucumeris*, the causal agent of Chinese amaranth foliage blight. Result showed that the peat moss-soil-cover culture method (PSC method) was more effective in producing hymenia of both *T. cucumeris* RSA-03 and RSA-09 isolates. The procedures of PSC method were as follows: (1) to inoculate each *Rhizoctonia* isolate onto potato-yeast extract-dextrose agar plate in a 9-cm petri dish, (2) to incubate the fungus at 28℃ for 4 days until its colony completely covered the agar plate surface, (3) to cover the agar plate surface with 90ml soil [included 40% (v/v) BVB No. 4 peat moss and maintained the soil moisture at 40-50% (v/v)], (4) to keep the soil-cover plates in moist chamber. Hymenial formation was observed after incubation for 4 days. The PSC method was suitable for hymenial formation of the pathogen and enable to enhance markedly 3-4 fold amount of hymenial production as compared to Naito's soil-cover-culture method. The factors affecting hymenial formation of the pathogen included temperature, humidity, light, aeration, and culture substrate. The suitable temperatures and pH values of covered soil for *R. solani* RSA-03 and RSA-09 hymenial formation were the range of 24 - 28℃ and pH 5 - 7, respectively. Covered soils amended with various organic matters and fungicides did significantly influence the hymenia formation of *T. cucumeris* RSA-03 and RSA-09. Result showed that the hymenia of the fungus were completely inhibited by 1%(v/v) fish meal, tea seed pomace and chinaberry meal. All the tested fungicides, such as mancozeb, benomyl, carbendazim, flutolanil, PCNB, iprodione and pencycuron were significantly effective in inhibiting the hymenial formation.

Key words: *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB, *Thanatephorus cucumeris*, hymenium, teleomorph